

534,262

Rec'd PCT/PTO 06 MAY 2005

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年5月21日 (21.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/042397 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/541 (74) 代理人: 筒井 知 (TSUTSUI,Satoru); 〒812-0011 福岡県福岡市博多区博多駅前3-30-15 ライオンズマンション博多906号 Fukuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/005733
- (22) 国際出願日: 2003年5月8日 (08.05.2003) (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-325026 2002年11月8日 (08.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉永 耕二 (YOSHINAGA,Kohji) [JP/JP]; 〒807-0855 福岡県北九州市八幡西区松寿山二丁目19番15号 Fukuoka (JP). 円福 敬二 (ENPUKU,Keiji) [JP/JP]; 〒814-0133 福岡県福岡市城南区七隈二丁目20番11号 Fukuoka (JP).
- 規則4.17に規定する申立て:
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HIGH SENSITIVITY MAGNETIC MARKER USED FOR IMMUNE RESPONSE MEASUREMENT

(54) 発明の名称: 免疫反応測定に用いられる高感度磁性マーカー

(57) Abstract: A high sensitivity magnetic marker preferably used for measurement of an immune response by using a SQUID magnetic sensor and a novel technique about the production are disclosed. A magnetic marker composed of magnetic particles and polymer coating the surfaces thereof and used for measurement of an immune response using a SQUID magnetic sensor. The particle diameter of the magnetic particles (preferably ferrite Fe_3O_4) is 20 to 40 nm. The outside diameter of the magnetic marker is 40 to 100 nm. The surface of the polymer contains a carboxyl group. The magnetic marker is produced by causing the surfaces of the magnetic particles to absorb a hydrophilic macromonomer (preferably polyvinyl pyrrolidone) having a polymerizable vinyl group and having a molecular weight of 500 to 1,000, adding a monomer having a carboxyl group and comprising a hydrophilic vinyl compound and a crosslinking agent, and copolymerizing them.

(57) 要約: SQUID磁気センサーによる免疫反応の測定に用いられるのに好適な高感度の磁性マーカーとその作製に関する新しい技術を開示している。磁性微粒子とその周りを被覆するポリマーとから構成され、SQUID磁気センサーにより免疫反応を測定するのに用いられる磁性マーカーにおいて、磁性微粒子(好ましくはフェライト Fe_3O_4)の粒子径が20~40nmであり、磁性マーカーの外径が40~100nmであり、さらに、ポリマーの表面にカルボキシル基を有するようにする。このSQUID磁気センサー用磁性マーカーは、磁性微粒子の表面に、末端に重合性ビニル基を有し親水性で分子量が500~1000のマクロモノマー(好ましくは、ポリビニルピロリドン)を吸着させた後、カルボキシル基を有し親水性のビニル化合物から成るモノマーと架橋剤とを加えて共重合させることによって作製することができる。

WO 2004/042397 A1

明 細 書

免疫反応測定に用いられる高感度磁性マーカー技術分野

- 5 本発明は、免疫反応を測定するための技術分野に属し、特に、SQUID 磁気センサーにより免疫反応を測定するのに用いられるきわめて高感度の磁性マーカーに関する。

背景技術

- 10 免疫反応、すなわち、抗原－抗体反応の測定は、病原菌等の検出、疾病の診断、遺伝子解析、環境関連物質の計測など広範な分野で利用されている。この免疫反応の測定は、被測定物質（抗原）とこれに特異的に結合する検査試薬（抗体）との結合を測定し、被測定物質の定性および／または定量を行なうものである。

- 15 免疫反応の測定には、これまで主として光学的な手法が用いられている。すなわち、発光酵素などの光学的マーカーを検査試薬（抗体）に付加し、そのマーカーからの光を測定することにより免疫反応（抗原－抗体反応）の検出を行なっている。しかし、近年、微量な反応を高感度で高速に検出する要求が非常に高まっているが、既存のシステムではこの要求を満たせなくなっている場合も多い。このため、高感度の新しいタイプの免疫反応測定システムの開発が望まれている。

- 20 最近、超伝導状態で出現する量子効果（磁束の量子化）を利用する SQUID（superconducting quantum interference device）は、極めて微弱な磁界の計測を可能にするため、高感度の磁気センサーとして注目されている。SQUID の最も大きな応用分野は、脳から発生する磁界を計測し脳機能の解明や診断を行なう脳磁界計測の分野であるが、その他の医学、材料評価、物質分析、精密計測、資源探査などの種々の分野への応用も始まっており、免疫反応の測定に SQUID を
- 25 用いることも提示されている（例えば、円福敬二「SQUID を用いた抗原－抗体反応計測」応用物理、第 70 巻、第 1 号、48～49 頁（2001）参照）。

SQUID を利用する免疫反応測定システムにおいては、磁性微粒子を内包するポリマーの表面に抗体が付加されて構成される磁性マーカーを用いて、その抗体が被測定物質の抗原との間で抗原-抗体結合反応を生じたときの磁界マーカーからの微弱な磁界信号を SQUID により測定する（図 1 参照）。実際の測定において

5 は、一般に、SQUID を固定し、サンプルを移動させて磁気信号を検出する方式が採られる。

SQUID を用いる免疫反応測定システムは、高感度センサーとして、例えば、蛍光抗体測定法に比べて約 10 倍の感度を得られることも確認されている（前記文献）が、システム性能を改善することにより更に高感度で免疫反応を検出することが

10 できるものと期待される。SQUID による免疫反応検出システムを改善するためのアプローチは、低雑音化（ノイズ低減）のように測定装置の性能向上を図るとともに、磁性マーカーとして最適なものを開発することである。

しかしながら、SQUID 磁気センサー用磁性マーカーの感度を高めるための条件を体系的に検討された従来技術は見当たらない。例えば、WO96/27133 (PCT

15 /EP96/00823) には、磁気センサーとして SQUID を用いることを含むイムノアッセイのための磁性粒子について言及されているが、SQUID 磁気センサー用磁性マーカーの感度を高める技術に関する具体的な開示はなされていない。例えば、磁性粒子の粒子サイズは 1~1000nm の広い範囲にあるとしており単に考えられる範囲を思いつきのままに定めたにすぎず、磁性粒子の粒径に関する技術的

20 検討は何ら行なわれていない。また、高感度の磁性マーカーを得るためのポリマーの種類やその合成法に関する具体的開示も全く見出されない。

ポリマー内部に磁気微粒子を内包し、その表面に抗体を結合した、如上の磁気標識抗体は、これまで主として抗体の精製・分離に用いられてきた。このような用途では磁性微粒子にいわゆる超常磁性を持たせるため、磁性微粒子としては粒子径が 10~15nm 程度であり、ポリマー粒子径（全体の外径）としては直径が 50

25 ~1000nm のものが市販されている。しかしながら、従来のこのような磁気標識

抗体を抗体抗原反応の検出に応用した場合には、磁気微粒子の特性が不充分であるため、高感度検出が阻害されている。

本発明の目的は、SQUID 磁気センサーによる免疫反応の測定に用いられるのに好適な高感度の磁性マーカーとその作製に関する新しい技術を提供することにある。

発明の開示

本発明者は、鋭意検討を重ねた結果、磁性マーカーの芯（コア）を形成する磁性微粒子の粒子径、およびその周りを被覆するポリマーの粒子径（厳密には磁性マーカー全体の外径）が、SQUID 磁気センサー用磁性マーカーの感度に影響することに留意するとともに、それらの因子の最適な磁性マーカーの作製が確保できるポリマー系を設計、合成することにより本発明を導き出したものである。

かくして、本発明に従えば、磁性微粒子とその周りを被覆するポリマーとから構成され、SQUID 磁気センサーにより免疫反応を測定するのに用いられる磁性マーカーであって、前記磁性微粒子の粒子径が 20～40nm であり、前記磁性マーカーの外径が 40～100nm であり、さらに、前記ポリマーの表面にカルボキシル基を有することを特徴とする SQUID 磁気センサー用磁性マーカーが提供される。本発明の磁性マーカーの好ましい態様に従えば、磁性微粒子は一般にフェライト Fe_3O_4 から成る。

本発明は、さらに、以上のような SQUID 磁気センサー用磁性マーカーを作製する方法であって、(i)磁性微粒子の表面に、末端に重合性ビニル基を有し親水性で分子量が 500～1000 のマクロモノマーを吸着させる工程、および(ii)その後、カルボキシル基を有し親水性のビニル化合物から成るモノマーと架橋剤とを加えて共重合させる工程を含むことを特徴とする方法を提供する。本発明に従う SQUID 磁気センサー用磁性マーカーの作製方法の好ましい態様においては、ポリマーの合成に用いられるマクロモノマーは、ポリビニルピロリドン、ポリオキシエチレンまたはポリアクリルアミドである。

図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の磁性マーカーを用いて SQUID 磁気センサーにより免疫反応を測定する原理を模式的に示す。

第 2 図は、本発明に従い磁性微粒子をポリマーコーティングする反応スキームと用いる反応物の構造式を例示する。

第 3 図は、本発明に従い磁性微粒子にマクロモノマーを吸着させる場合の吸着等温線（25℃）を例示する。

第 4 図は、本発明に従い磁性微粒子をポリマーコーティングして得られる複合粒子（磁性マーカー）の粒子径分布を例示する。

10 第 5 図は、本発明に従いポリマーコーティングする前の未修飾フェライト微粒子を示す電子顕微鏡（SEM）写真である。

第 6 図は、本発明に従いポリマーコーティングによって得られた複合粒子（磁性マーカー）の電子顕微鏡（SEM）写真の 1 例である。

15 第 7 図は、本発明の磁性粒子に抗体を結合させた場合の結果の 1 例を示すグラフである。

第 8 図は、本発明に従う磁性マーカー中の磁性微粒子の重量と SQUID 出力の関係を示す 1 例である。

第 9 図は、本発明に従う抗体結合磁性マーカーを用いてタンパク質の検出を行なった場合のタンパク質の量と SQUID 出力の関係を示す 1 例である。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明は、SQUID 磁気センサー用磁性マーカーの感度を支配する問題点をひとつひとつ検討しながらそれらの技術の総まとめとして目的の超高感度磁性マーカーが得られたことに基づくものである。以下、それらの問題点に沿って本発明の実施の形態を詳述する。

25 （１）磁性微粒子とその粒子径：

本発明者が見出したところによれば、SQUID 磁気センサーに用いられる磁性

マーカーにおいては、ポリマー粒子に内包された磁性微粒子の粒子径（直径）として既述したような市販の磁気微粒子より大きく、20～40nm のものが必要となる。これは、磁性微粒子からの磁気信号は微粒子の体積に比例するため、大きな微粒子により大きな信号が得られるためである。さらに、磁性微粒子の体積が大きくなると磁気特性は大きく変化し、微粒子はいわゆる超常磁性の特性から残留磁気をもつ特性へと変化する。これによって磁性微粒子からの磁気信号は極めて大きくなる。

なお、このような磁気が発生するための最小粒子径は、次のような理論的計算によっても裏づけられる：磁性微粒子の体積をV、その磁気異方性エネルギーをKとすると、超常磁性から残留磁気特性への変化は、 $KV/k_B T \sim 20$ (k_B はボルツマン定数、 $T=300K$) で生じることになる。磁気微粒子として Fe_3O_4 を用いた場合には $K=10\sim20$ (kJ/m^3) と見積もられるので、このときの微粒子の直径は $d=20\sim25nm$ となる。従って微粒子の大きさとしては $d>20nm$ が望ましいことが理解される。

一方、本発明が対象とする水溶液中で抗原（被測定物質）と結合するように用いられる磁気標識抗体としては、十分な分散性を持つことが重要である。分散性が悪いと抗原－抗体の結合反応が阻害されてしまう。磁性微粒子の大きさがあまり大きくなりすぎると分散性が悪くなるとともに、沈降が顕著になる。この問題を避けるためには磁性微粒子を内包した高分子全体（厳密に言えば、磁性マーカー全体）の比重を 1～3 程度に保つ必要がある。従って、磁性微粒子の大きさとしては $d<40nm$ 程度にする必要がある。

用いる磁性微粒子としては、基本的には、鉄鉱、 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 など何れも使用できるが、最大の磁力を示す Fe_3O_4 であるフェライトが特に好ましい。

(2) 磁性マーカーの外径：

さらに、本発明の SQUID 磁気センサー用磁性マーカーにおいては、ポリマー粒子の直径（厳密には、磁性マーカー全体の外径）は 40nm 以上であって 100nm

以下のものが必要となる。これは、免疫反応（抗原－抗体の結合反応）検出においてポリマーの大きさが大きすぎると磁気標識抗体と抗原との結合が効率的に行なわれないためである。さらに、磁性微粒子に関連して上述したように、磁性マーカーの粒子径（外径）が全体として大きすぎると分散性が悪くなり沈殿が生じ

5 易くなることから好ましくない。

（３）採用するポリマー系：

以上のような特性を有する SQUID 磁気センサー用磁性マーカーは、本発明者によって設計されたポリマー系を用いることによって最適に作製することができる。すなわち、本発明に従えば、磁性微粒子の表面に、末端に重合性ビニル基を
10 有し親水性で分子量が 500～1000 のマイクロモノマーを吸着させた後、カルボキシル基を有し親水性のビニル化合物から成るモノマーと架橋剤とを加えて共重合させることによって、磁性微粒子に対して効果的にポリマーコーティング（被覆）が行なわれ、磁性微粒子の粒子径が 20～40nm で磁性マーカーの外径が 40～100nm であり、ポリマーの表面にカルボキシル基を有する SQUID 磁気センサー
15 用磁性マーカーを得ることができる。

用いるマイクロモノマーとして特に好適な例は、ポリビニルピロリドンであるが、その他に、ポリオキシエチレンまたはポリアクリルアミドなどを用いることもできる。このようなマクロモノマーの磁性微粒子への吸着は、一般に、フェライト Fe_3O_4 に代表される磁性微粒子をメタノール中に分散させ、その分散溶液
20 にマクロモノマーを添加し、室温下に数時間攪拌することによって行われる。

次に、マクロモノマーが吸着された磁性微粒子を、低極性溶媒（例えばテトラヒドロフラン）中に分散させて、架橋剤とモノマーの共重合（ラジカル重合）によって磁性微粒子の表面にポリマーコーティングを行なう。架橋剤としては、一般に、トリビニル化合物を用いる。また、モノマーとしては、カルボキシル基を
25 有するとともに、分子全体として親水性のビニル化合物が好ましい。カルボキシル基の他には親水性基を有さず長いアルキル鎖を含むなどの構造から成る疎水性

のモノマーを用いると、得られる磁性マーカの分散安定性が悪くなる。

このように、本発明で採用するポリマー系は、磁性微粒子のポリマーコーティングとして従来存しない新しい技術思想に基づくものである。ポリビニルピロリドンを用いる磁性体としては、ビニルピロリドン-酢酸ビニルの共重合樹脂に磁性体粉末を練り込む方法は報告されている（特開2000-28616）が、本発明の方法は、如上の説明から明らかなように、これとは全く異なるものである。

本発明に従えば、フェライト Fe_3O_4 のような磁性微粒子を均一に一定厚みの合成ポリマーで抱合し、しかもこの磁性微粒子-合成ポリマー複合体表面に所定量のカルボキシル基を付けることができる。すなわち、磁性マーカー粒子1個あたりポリマー表面にカルボキシル基を500~5000残基、望ましくは、2000~3000残基を有するようにすることができる。

また、本発明の方法に従えば、先ずフェライト超微粒子の表面にマクロモノマーを吸着させ、その後、カルボキシル基をもつモノマーを加え、架橋剤によってラジカル共重合させるという各工程の条件を適宜変えることにより、磁性マーカの粒子サイズを40~100nmの範囲で自由にコントロールすることができる。さらに、本発明の方法は粒子間凝集を誘起することなく、個々の磁性微粒子表面にカルボキシル基をもつポリマーで被覆させることができる。

(4) 磁性マーカの特性

以上のようにして得られる本発明の SQUID 磁気センサー用磁気マーカーは、分散安定性に優れ、一般に、水溶液中において1ヶ月以上安定に分散させることができる。

本発明の SQUID 磁気センサー用磁気マーカーは、その表面に多数のカルボキシル基を有しているので、そのカルボキシル基を介して抗体を結合させることができる。そして、本発明の磁性マーカーは、抗体を高効率で結合させることができ、1例として、ウサギの抗体である IgG を80%以上の収率で結合させることができた。

抗体が結合された本発明の磁性マーカーは、既述したように免疫反応（抗原－抗体反応）の測定に供されるが、その感度はきわめて高く、1例として、1pg（ピコグラム）以下の抗原（タンパク質）の測定もできる。

実施例

- 5 以下、本発明の特徴をさらに具体的に示すため実施例を記すが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

実施例 1：ポリマーコーティングフェライト微粒子の調製

- 図2に概示する反応スキームに従って、表面にカルボキシル基を有するポリマーコーティングフェライト微粒子（SQUID 磁気センサー用磁性マーカー）を調製した。

<フェライト微粒子へのポリビニルピロリドンの吸着>

- メタノール 10ml にマクロモノマーとしてポリビニルピロリドン（分子量 520）の 0.004～0.04g 範囲内の一定量を溶解させた後、フェライト Fe_3O_4 （戸田工業製、粒子径 25nm）微粒子 0.05 g を加えて、超音波を照射した。静かに 4 時間かきまぜたのち、ポリビロリドン（分子）を吸着した粒子を遠心分離器を用いて分離し、減圧乾燥させた。吸着量は、100～800℃までの昇温時における重量減少から算出した。図3に吸着等温線を示す。ポリビニルピロリドンがフェライト微粒子 1g あたり $1.0 \times 10^{-3} \text{mol}$ に達して、一定になるとことがわかった。

<ラジカル共重合によるフェライト微粒子のポリマーコーティング>

- 20 親水性マクロモノマーが吸着されたフェライト微粒子を以下に詳述するようにテトラヒドロフランに分散させて AIBN（重合開始剤）の存在下、架橋剤（トリビニル化合物）とモノマーの共重合によって微粒子表面のポリマーコーティングを行なった。

- 25 <コーティング 1：トリ（（アクロイルオキシ）エチレン）アミン塩酸塩(a)と N-アクロイルアミノペンタン酸(b)の共重合によるフェライト微粒子のポリマーコーティング>

テトラヒドロフラン 5ml に N-アクロイルペンタン酸 0.12 g (フェライト微粒子に吸着したポリビニルピロリドンのビニル基量の 100 倍量) および 0~100 倍量の架橋剤トリ (アクロイルオキシ) アミン塩酸塩を溶解させた。この溶液にフェライト微粒子 1g あたり 0.2 g のポリビニルピロリドンを吸着した粒子 0.018 g、
 5 さらに 2, 2'-アゾビス (イソブチルニトリル) 0.01 g を加えた後、65°C に 10 時間かきませた。複合粒子は遠心分離によって溶液から分離した。この操作を 5 回繰り返して、未反応モノマーおよび架橋剤を分離した。表 1 に、この方法で得られたフェライト微粒子表面のポリマー量を示した。この表 1 から、架橋剤の増加とともにポリマー結合量が増大するが、動的光散乱法 (DLS) により測定した
 10 粒子径は 29~30nm 程度であり、粒子間凝集は起こっていないことがわかる。(なお、DLS 法による粒子径は、一般に、後述するような顕微鏡観察による実際の値よりは低くなる。) しかしながら、この方法で調製した複合粒子は、水中での分散継続時間が比較的短く、最大 2 日間であった。これは、モノマー(b)のメチレン鎖が長い
 15 ため疎水性が高くなり水溶液中で低極性相互作用により粒子間凝集が起こり易くなるためと考えられる。

表 1

エントリ-	架橋剤 a	モノマー b	結合ポリマー量	粒子径	分散継続時間
	$10^{-3}\text{mol/g-Fe}_3\text{O}_4$	$10^{-3}\text{mol/g-Fe}_3\text{O}_4$	$\text{mg/g-Fe}_3\text{O}_4$	nm	
1	0	37.7	527	32	2 日
2	0.4	37.7	656	30	6 時間
3	3.7	37.7	706	30	6 時間
4	18.9	37.7	733	30	6 時間
5	37.7	37.7	866	29	6 時間

<コーティング 2 : トリ ((アクロイルオキシ) エチレン) アミン塩酸塩(a)と N-アクロイルグリシン(c)の共重合によるフェライト微粒子のポリマーコーティング>
 25

このコーティングは、上記コーティング 1 と同様の操作で行なった。その結果を表 2 に示す。このコーティングにおいても、架橋剤の増大とともに結合ポリマー量が増大し、最大 870mg/g に達した。得られた複合粒子のうち、特に、650~700mg/g の結合ポリマー量をもつ粒子が 4 週間以上水溶液中で安定に分散し続けた。また、表面カルボキシル基量も架橋剤とともに増大し、最大 60 $\mu\text{mol/g}$ となった。なお、粒子径は DLS 法によるものである。

表 2

エントリー	架橋剤 a	モノマー c	結合ポリマー量	粒子径	表面カルボキシル基量	分散継続時間
	$10^{-3}\text{mol/g-Fe}_3\text{O}_4$	$10^{-3}\text{mol/g-Fe}_3\text{O}_4$	mg/g- Fe_3O_4	nm	$\mu\text{mol/g}$	
1	0	39.8	527	34	26.6(1050)	4 週間
2	0.4	39.8	656	26	28.6(1200)	4 週間以上
3	4.0	39.8	706	29	41.4(1800)	4 週間以上
4	19.9	39.8	733	25	51.9(2350)	2 週間
5	39.8	39.8	866	33	59.7(2900)	2 週間

() 内は、粒子 1 個あたりポリマー表面に存在するものとして換算したカルボキシル基の数を表わす。

<コーティング 3 : トリ ((アクロイルオキシ) エチレン) アミン塩酸塩(a)と N-アクロイルグルタミン酸(d)の共重合によるフェライト微粒子のポリマーコーティング>

このコーティングは、コーティング 1 と同様の操作で行なった。その結果を表 3 に示す。表中の粒子径は DLS 法によるものである。このコーティングにおいても粒子間凝集は生じず、また架橋剤とともに結合ポリマー量は増大し、最大 947mg/g となった。図 4 に表 3 中エントリー 4 で得られた複合粒子の粒子径分布 (DLS 法) を示した。凝集による大径の粒子は存在しないことが理解される。また、表面カルボキシル基量も架橋剤濃度とともに増大し、最大 97mmol/g に達した。この量は、粒子表面にカルボキシル基が単位平方ナノメートルあたり 0.7 個存在することに相当する。さらに、このコーティングで得られた複合粒子はすべ

て水溶液中で 4 週間以上も安定に分散し続けた。

表 3

エントリ-	架橋剤 a	モ/マ- c	結合ポリマー量	粒子径	表面カルボキシル基量	分散継続時間
	$10^{-3}\text{mol/g-Fe}_3\text{O}_4$	$10^{-3}\text{mol/g-Fe}_3\text{O}_4$	$\text{mg/g-Fe}_3\text{O}_4$	nm	$\mu\text{mol/g}$	
1	0	31.7	433	34	37.8(1400)	4 週間以上
2	0.3	31.7	476	30	47.5(1750)	
3	3.2	31.7	648	26	73.6(3100)	
4	15.8	31.7	871	27	92.7(4500)	
5	31.7	31.7	947	27	97.2(4850)	

() 内は、粒子 1 個あたりポリマー表面に存在するものとして換算したカルボキシル基の数を表わす。

図 5 および図 6 に、未修飾フェライト微粒子とコーティング 3 で得られたポリマーコーティングフェライト微粒子の電子顕微鏡 (SEM) 写真を示す。未修飾粒子の SEM 写真では、試料作成時の乾燥操作中に粒子間の凝集が観測されたが、ポリマーコーティングフェライト微粒子は良好に分散しており、その外径 (直径) は約 80nm であることが確認された。

なお、表 2 および表 3 に示すポリマー表面のカルボキシル基の定量は次のように実施した：脱水、蒸留したクロロホルム 5ml に複合粒子 (ポリマーコーティングフェライト微粒子) 10mg および N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド 15mg を加えた後、氷冷下で 2 時間かき混ぜた。その分散溶液へ p-ニトロフェノールイミド 15mg を加えて、室温で 12 時間かき混ぜた。未反応 p-ニトロフェノールを遠心分離による洗浄によって複合粒子から分離した後、その粒子を減圧下に乾燥した。次に、その p-ニトロフェノレート基を結合した粒子を精秤した後、4%アンモニア水 4ml 中に分散させて、12 時間静かにかき混ぜた。p-ニトロフェノールを遊離した溶液を複合粒子から遠心分離操作によって分離したのち、洗浄液とあわせて溶液の全容量を 10.0ml に調整した。この水溶液中に含まれる p-ニトロフェノール量は波長 400nm (モル吸光係数 $\epsilon = 18000$) の吸光度

から決定した。

実施例 2：抗体の結合

実施例 1 のコーティング 3 の方法で調製したポリマーコーティングフェライト微粒子（磁性マーカー）0.017g を pH7.0 リン酸緩衝溶液 5ml 中へ分散させて、

- 5 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 0.01g を加えた。この溶液を 4°C で 1 時間かき混ぜたあと、ウサギ抗体 IgG 0.16mg（微粒子 1g あたり 9.3mg/g）を加え、続いて室温で 6 時間かき混ぜた。抗体を結合した粒子は、リン酸緩衝溶液から遠心分離によって分離した。結合した抗体量は、7.0m/g であった。抗体の結合量は、この反応において仕込んだ抗体量から非結合
- 10 抗体量を差し引いた量とした。これらの量は、波長 280nm における吸光度から決定した。

図 7 にウサギ IgG のポリマー被覆フェライト微粒子への結合結果を示す。粒子 1 グラムあたり 10mg 程度の添加では、添加量の 80% 程度が結合し、本発明の方法で得られる複合粒子（磁性マーカー）が抗体に対して高い固定化効率を示す

15 ことが明らかとなった。

実施例 3：磁性体重量と SQUID 出力関係

- 実施例 1 のコーティング 3 の方法で調製され、直径が 25nm の Fe_3O_4 微粒子をポリマーコーティングしその表面にカルボキシル基を結合させた外径 80nm の磁性マーカーからの磁気信号を SQUID 磁気センサーで計測した。磁気マーカー
- 20 の重さを変化させた時の SQUID 出力の測定結果を図 8 に示す。図の横軸は磁性マーカー中のフェライト微粒子の重さ (pg) であり、縦軸は SQUID 出力 ($\text{m}\Phi_0$) を示す。同図に示すようにマーカーの重さと SQUID 出力の間には非常によい相関が得られた。SQUID センサーは $0.1\text{m}\Phi_0$ 以下のレベルまで測定できるので、図から本磁性マーカーでは 1pg 以下のフェライト微粒子が測定できることがわか
- 25 る。

実施例 4：抗体を結合した磁性マーカーと SQUID 出力関係

実施例 2 のように抗体を結合させた磁性マーカーと SQUID 磁気センサーを用いて抗原（タンパク質）の検出を行なった。前記ウサギ IgG に特異的なタンパク質と該抗体の結合量を磁性マーカーからの磁気信号を用いて測定した。図 9 にタンパク質の量と SQUID 出力の測定結果を示す。図の横軸はタンパク質の重さ（pg）であり、縦軸は SQUID 出力（ $m\Phi_0$ ）を示す。同図に示すようにタンパク質の重さと SQUID 出力の間には非常によい相関が得られた。SQUID センサーは $0.1m\Phi_0$ 以下のレベルまで測定できるので、図から本磁性マーカーでは $0.2pg$ 程度のタンパク質が測定できることがわかる。

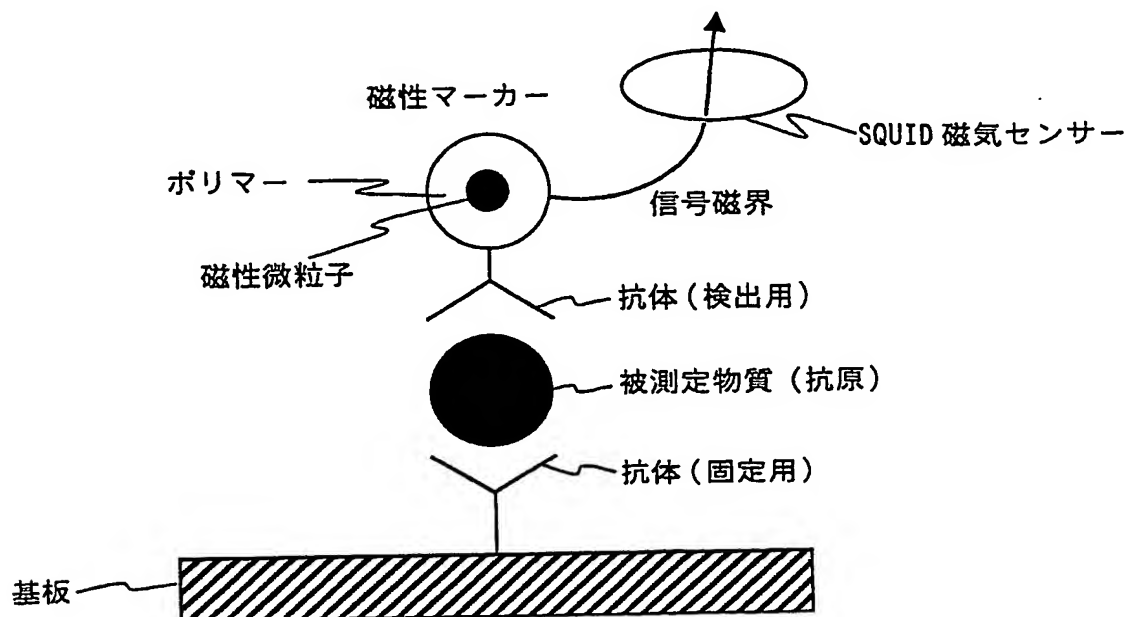
産業上の利用可能性

- 10 以上の説明から明らかなように、本発明の磁性マーカーは、高温超伝導 SQUID との組み合わせにより、超高感度に免疫反応（抗原抗体反応）を測定できるために、長足に進歩している最近の医療関連でも有用であり、従来は不可能であった生体内物質の測定も可能とすることによって新事実の発見に繋がる等、多くの分野で寄与するものと期待される。

請求の範囲

1. 磁性微粒子とその周りを被覆するポリマーとから構成され、SQUID 磁気
センサーにより免疫反応を測定するのに用いられる磁性マーカーであって、前記
5 磁性微粒子の粒子径が 20~40nm であり、前記磁性マーカーの外径が 40~100nm
であり、さらに、前記ポリマーの表面にカルボキシル基を有する SQUID 磁気セ
ンサー用磁性マーカー。
2. 前記磁性微粒子がフェライト Fe_3O_4 から成る請求項 1 に記載の磁性マ
ーカー。
- 10 3. 前記磁性マーカーの粒子 1 個あたりポリマー表面に 500~5,000 残基のカ
ルボキシル基を有することを特徴とする請求項 2 に記載の磁性マーカー。
4. 前記磁性マーカーの粒子 1 個あたりポリマー表面に 2000~3000 残基のカ
ルボキシル基を有することを特徴とする請求項 3 に記載の磁性マーカー。
5. 磁性微粒子とその周りを被覆するポリマーとから構成され、SQUID 磁気
15 センサーにより免疫反応を測定するのに用いられる磁性マーカーであって、前記
磁性微粒子の粒子径が 20~40nm であり、前記磁性マーカーの外径が 40~100nm
であり、さらに、前記ポリマーの表面にカルボキシル基を有する SQUID 磁気セ
ンサー用磁性マーカーを作製する方法であって、(i)磁性微粒子の表面に、末端に
20 重合性ビニル基を有し親水性で分子量が 500~1000 のマクロモノマーを吸着さ
せる工程、および(ii)その後、カルボキシル基を有し親水性のビニル化合物から成
るモノマーと架橋剤とを加えて共重合させる工程を含む方法。
6. 前記マクロモノマーが、ポリビニルピロリドン、ポリオキシエチレンまた
はポリアクリルアミドである請求項 5 に記載の磁性マーカー作製方法。

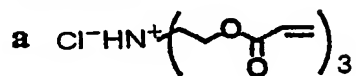
第 1 図



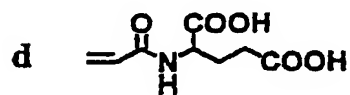
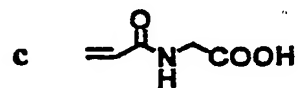
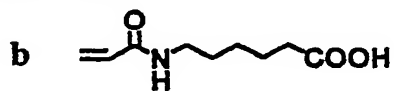
第 2 図



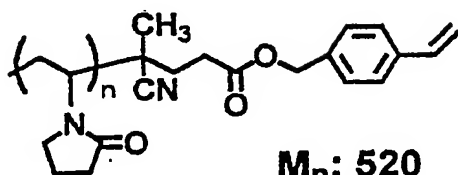
架橋剤



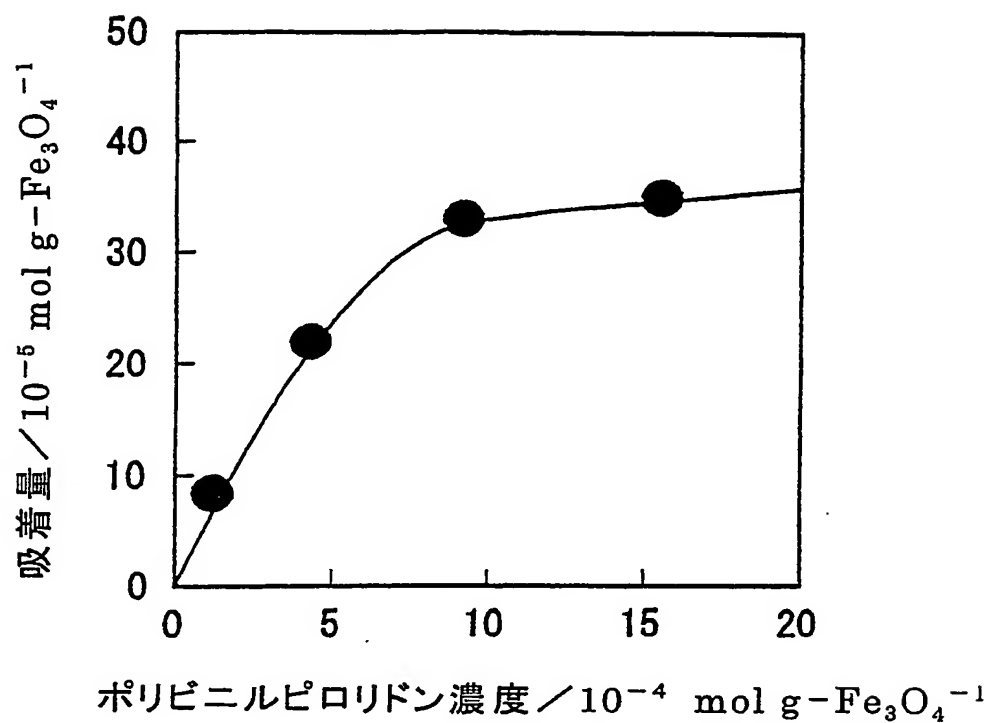
モノマー



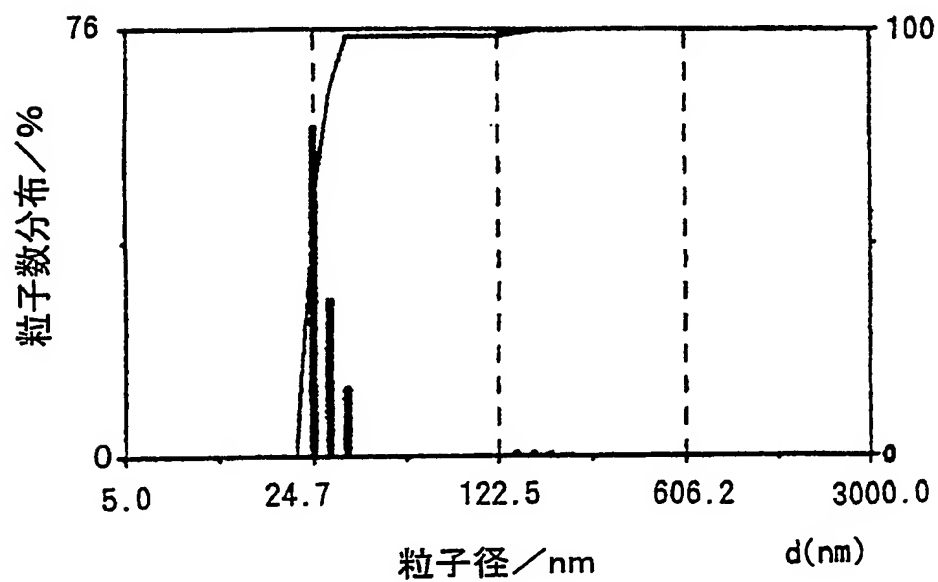
マクロモノマー



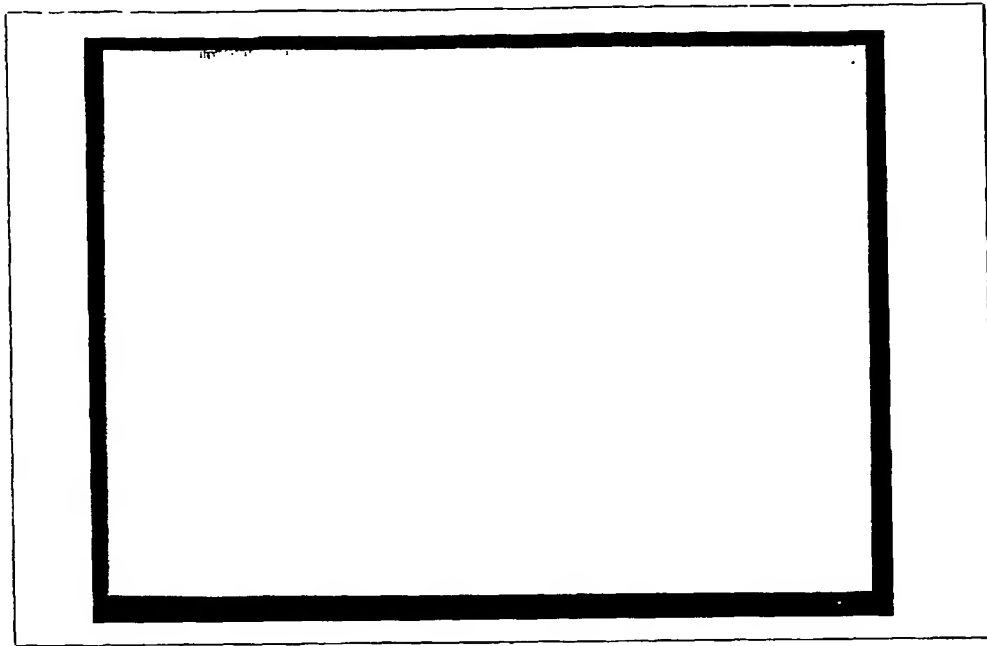
第3図



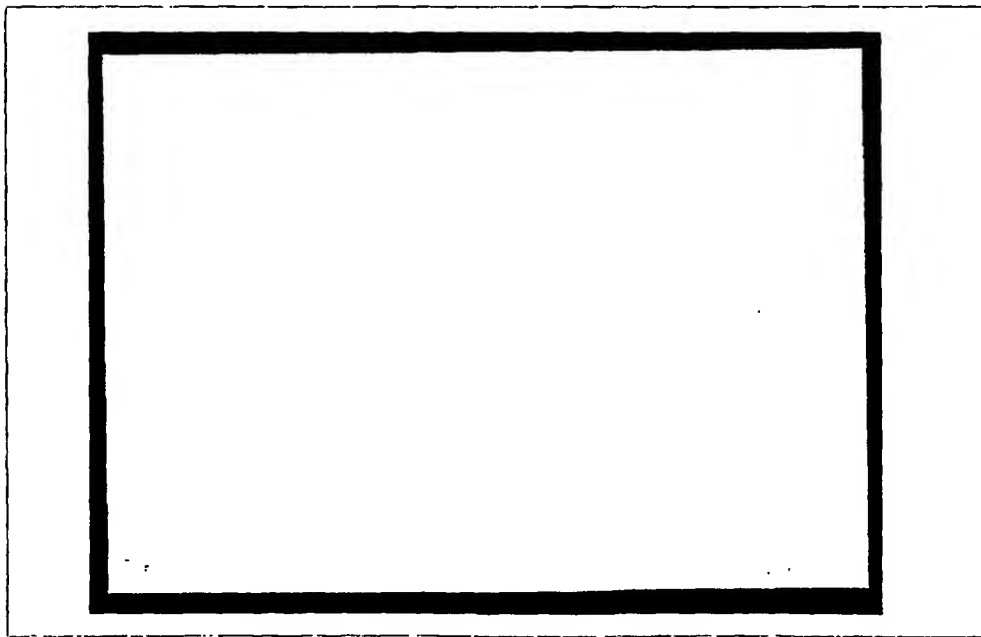
第4図



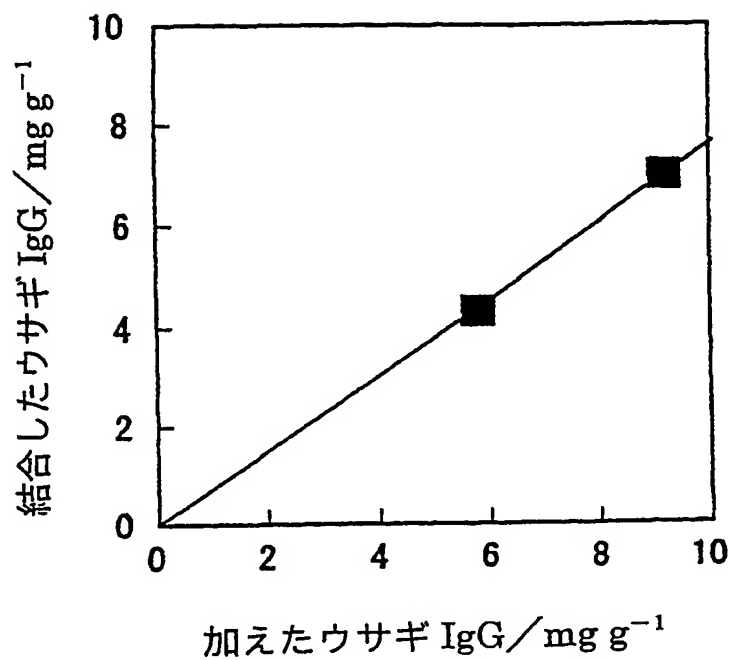
第 5 図



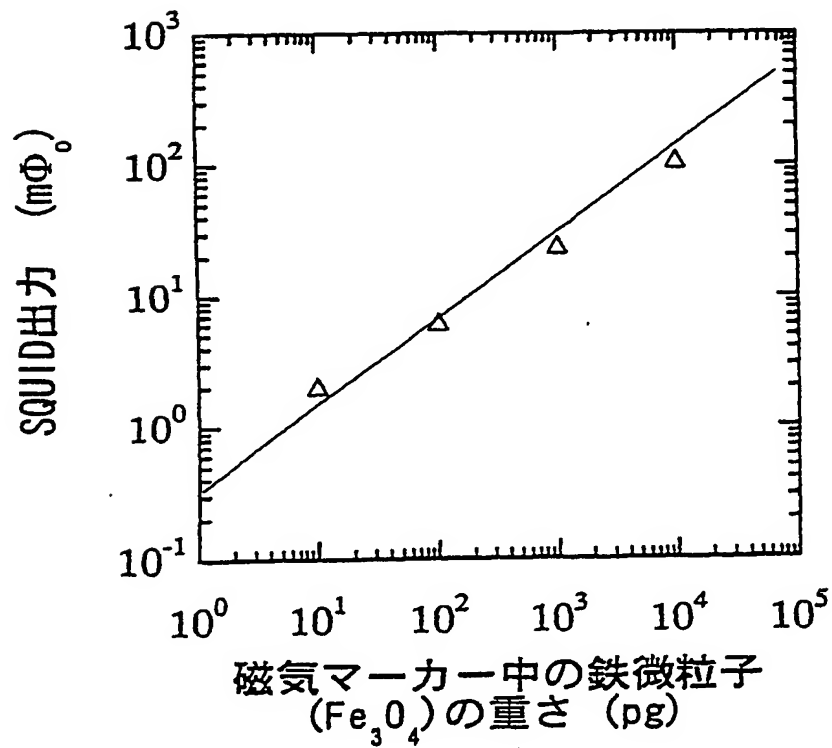
第 6 図



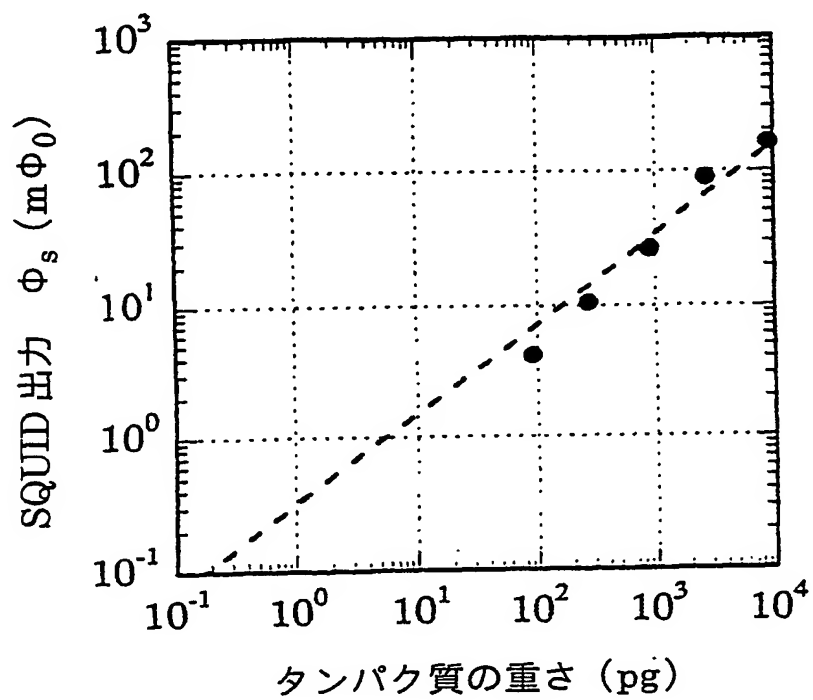
第7図



第8図



第9図



第VIII欄 (v) 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

申立ては実施規則第 215 号に規定する標準文書を使用して作成しなければならない。第VIII欄と同欄(i)～(v)の備考の秘論部分、及び本頁に特有の事項について第VIII欄(v)の備考を参照。この欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v)及び 51 の 2.1(a)(v))

科学技術振興事業団は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。

1 (i) 開示の種類：刊行物（学会予稿集）発表

(ii) 開示の日付：2002年5月10日 (10.05.02)

(iii) 開示の名称：高分子学会予稿集51巻4号880頁
「表面にカルボキシル基を有するポリマー修飾フェライト超微粒子の調製」

(iv) 開示の場所：

(v) 本申立ては、すべての指定国のためになされたものである。

2 (i) 開示の種類：学会発表

(ii) 開示の日付：2002年5月31日 (31.05.02)

(iii) 開示の名称：高分子学会年次大会

(iv) 開示の場所：第51回高分子学会年次大会

(v) 本申立ては、すべての指定国のためになされたものである。

3 (i) 開示の種類：刊行物（学会予稿集）発表

(ii) 開示の日付：2002年5月20日 (20.05.02)

(iii) 開示の名称：繊維学会予稿集2002 57巻1号（年次大会）131頁
「表面にカルボキシル基を有するポリマー修飾フェライト超微粒子の調製」

(iv) 開示の場所：

(v) 本申立ては、すべての指定国のためになされたものである。

4 (i) 開示の種類：学会発表

(ii) 開示の日付：2002年5月24日 (24.05.02)

(iii) 開示の名称：繊維学会年次大会

(iv) 開示の場所：平成14年度繊維学会年次大会

(v) 本申立ては、すべての指定国のためになされたものである。

☐ この申立ての続業として「第VIII欄(v)の続き」がある

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/541

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/541

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-048213 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 20 February, 1998 (20.02.98), (Family: none)	1-4
X	Koji YOSHINAGA et al., 'Hyomen ni Carboxyl-ki o Motsu Polymer Shushoku Ferrite Biryushi no Cyosei', Fiber Preprints, Japan, Vol.57, No.1, page 131, (2002)	5, 6
X	Taeko NAKAHARA et al., 'Hyomen ni Carboxyl-ki o Yusuru Polymer Shushoku Ferrite Biryushi no Chosei', Polymer Preprints, Japan, Vol.51, No.4, page 880, (2002)	5, 6
A	JP 08-043391 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 16 February, 1996 (16.02.96), (Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 August, 2003 (12.08.03)

Date of mailing of the international search report
09 September, 2003 (09.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/541

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/541

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 10-048213 A (三菱化学株式会社) 1998. 02. 20 (ファミリーなし)	1-4
X	吉永耕二ほか「表面にカルボキシル基を持つポリマー修飾フェライト微粒子の調製」, Fiber Preprints, Japan, Vol.57, No.1, p131 (2002)	5, 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 08. 03

国際調査報告の発送日

09.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	中原多恵ほか「表面にカルボキシル基を有するポリマー修飾フェライト微粒子の調製」, Polymer Preprints, Japan, Vol.51, No.4, p880, (2002)	5, 6
A	J P 08-043391 A (三菱化学株式会社) 1996. 02. 16 (ファミリーなし)	1-6